

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-033453
(43)Date of publication of application : 09.02.2001

(51)Int.Cl. G01N 33/543
C12N 11/02
C12N 11/14
C12Q 1/25
G01N 33/545
G01N 33/553
// G01N 33/537

(21)Application number : 11-210424 (71)Applicant : EIKEN CHEM CO LTD
(22)Date of filing : 26.07.1999 (72)Inventor : SUAI SHIN
SHIBATA NORIO
OHIRO YOSHIYUKI

(54) MEASURING METHOD FOR LIGAND

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To measure a trace component in a sample much more accurately as compared with conventional methods in a measuring method for a ligand, wherein a complex which is formed by reacting a labeling receptor with the ligand is separated by a separation means and the labeling receptor which does not participate in the reaction with the ligand and which passes the separation means is measured.

SOLUTION: This measuring method for a ligand is provided with a process (a) wherein a complex is formed in such a way that particles which comprise a receptor specific with reference to the ligand and/or which comprise a receptor specific with reference to the ligand on the surface, particles which comprise a receptor specific to the ligand and/or which comprise a labeling receptor specific to the ligand and/or which comprise a labeling receptor specific to the ligand on the surface and a sample which contains the ligand are reacted. The measuring method is provided with a process (b) in which the formed complex is separated by a separation means. The measuring method is provided with a process (c) wherein particles which comprise the irradiated labeling receptor passing the separation means without participating in the reaction with the ligand and/or which comprise an unreacted labeling receptor are developed in a development phase. The measuring method is provided with a process (d) in which the amount of the developed unreacted labeling receptor is measured.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2001-33453

(P2001-33453A)

(43)公開日 平成13年2月9日(2001.2.9)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マークコード(参考)
G 01 N 33/543	5 2 1	G 01 N 33/543	5 2 1 4 B 0 3 3
	5 4 1		5 4 1 Z 4 B 0 6 3
C 12 N 11/02		C 12 N 11/02	
11/14		11/14	
C 12 Q 1/25		C 12 Q 1/25	

審査請求 未請求 請求項の数9 OL (全10頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平11-210424	(71)出願人	000120456 榮研化学株式会社 東京都文京区本郷1丁目33番8号
(22)出願日	平成11年7月26日(1999.7.26)	(72)発明者	陳合 伸 栃木県下都賀郡野木町野木143 榮研化学 株式会社野木事業所内
		(72)発明者	柴田 典緒 栃木県下都賀郡野木町野木143 榮研化学 株式会社野木事業所内
		(72)発明者	大広 義幸 栃木県下都賀郡野木町野木143 榮研化学 株式会社野木事業所内
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リガンドの測定方法

(57)【要約】

【課題】本発明は、標識レセプターとリガンドとを反応させて形成する複合体を分離手段により分離し、リガンドとの反応に関与しないで分離手段を通過した標識レセプターを測定する新規なリガンドの測定方法であり、従来の方法に比べて一層精密な試料中の微量成分の測定が可能となるリガンドの測定方法の提供。

【解決手段】以下の工程を含むリガンドの測定方法。

(a)リガンドに対して特異的なレセプター、および/または表面に前記リガンドに対して特異的な前記レセプターを有する粒子と、前記リガンドに対して特異的な前記標識レセプターを有する粒子と、前記リガンドを含む試料とを反応させて複合体を形成する工程、(b)形成した前記複合体を分離手段により分離する工程、(c)前記リガンドとの反応に関与しないで前記分離手段を通過した未反応の前記標識レセプター、および/または該未反応の標識レセプターを有する粒子を展開相で展開する工程、(d)展開した前記未反応の標識レセプター量を測定する工程。

【特許請求の範囲】

【請求項1】以下の工程を含むリガンドの測定方法。
 (a)リガンドに対して特異的なレセプター、および／または表面に前記リガンドに対して特異的な前記レセプターを有する粒子と、前記リガンドに対して特異的な標識レセプター、および／または表面に前記リガンドに対して特異的な前記標識レセプターを有する粒子と、前記リガンドを含む試料検体とを反応させて複合体を形成する工程、(b)形成した前記複合体を分離手段により分離する工程、(c)前記リガンドとの反応に関与しないで前記分離手段を通過した未反応の前記標識レセプター、および／または該未反応の標識レセプターを有する粒子を展開相で展開する工程、(d)展開した前記未反応の標識レセプター量を測定する工程。

【請求項2】以下の工程を含むリガンドの測定方法。
 (a)リガンドに対して特異的なレセプター、および／または表面に前記リガンドに対して特異的な前記レセプターを有する粒子と、標識リガンドおよび／または標識リガンドを有する粒子と、前記リガンドを含む試料検体とを反応させて複合体を形成する工程、(b)形成した前記複合体を分離手段により分離する工程、(c)前記レセプターとの反応に関与しないで前記分離手段を通過した未反応の標識リガンド、または標識リガンドを有する粒子を展開相で展開する工程、(d)展開した前記未反応の標識リガンド量を測定する工程。

【請求項3】分離手段がフィルターなどの多孔性膜、濾紙、多孔性セラミック、繊維層等の物理的分離手段である請求項1または2記載の方法。

【請求項4】リガンドが抗原(または抗体)、酵素、一本鎖DNA、ビオチンであり、それぞれに対応するレセプターが抗体(または抗原)、基質、前記DNAの相補鎖、アビシンである請求項1または2記載の方法。

【請求項5】リガンドが抗原(または抗体)であり、レセプターが抗体(または抗原)または加工抗体である請求項4記載の方法。

【請求項6】加工抗体が重合化抗体、half IgG、Fab、F(ab')2、Fab'、Fvである請求項5記載の方法。

【請求項7】標識が酵素、発色団、蛍光団、発光団、放射性同位元素、染色ゲル、金属コロイド、着色ラテックスである請求項1または2記載の方法。

【請求項8】測定が反射率または透過率によって定量的に行われる請求項1または2記載の方法。

【請求項9】粒子が不溶性担体粒子、好ましくはラテックス粒子である請求項1または2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体試料中のリガンドの測定方法に関し、特に妊娠の診断、便潜血の有無の判定、細菌やウイルス検査などを目的として、尿、糞便、血液などの生体試料中に含有されるリガンドをクロ

マトグラフィー媒体を利用して測定する方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来から、医学診断薬の分野で液体試料中に含まれる微量物質の測定法として種々の分析法が開発されている。とりわけ、高感度測定法として抗原抗体反応を利用した免疫分析法が幅広く用いられ、臨床分野ではこの測定原理を応用した装置を用いて微量物質を分析している(特開昭47-18597号公報、同53-147518号公報等)。

【0003】更に、医院や一般家庭でも、この免疫反応を利用した簡易測定の必要性が高まり、その目的のための簡易型測定装置の開発も進歩しつつあり、中でもいわゆる「スティック」と呼ばれる測定装置または免疫測定方法が数多く提案されている(特表昭62-501034号公報、特開昭63-118657号公報、同64-463号公報等)。

【0004】この免疫測定方法では、一般にクロマトグラフィー媒体を用いて展開された試料中の抗原を酵素、蛍光物質または発光物質などの標識物質で標識された第一抗体と反応させ、クロマトグラフィー媒体上に固定された第二抗体との間で抗体-抗原-標識抗体複合体の所謂サンドイッチ型免疫複合体を形成させ、固定化されたマーカーに由来する発色、蛍光、発光に基づいて測定対象物質量を測定するというものである(特開平5-150881号公報、同5-150882号公報等)。

【0005】しかしながら、これらの方法においては、マーカー標識抗体として、測定対象物質の認識部位が測定対象物質中に通常1つしかないモノクローナル抗体を用いた場合には、固定化抗体-測定対象物質-マーカー標識抗体からなる所謂サンドイッチ型免疫複合体中のマーカー粒子(金コロイド、着色ラテックス等)は、測定対象物質1個に対して少なくとも1個にしかなり得ないため必ずしも充分な感度が得られない、という問題点があった(特開平10-68730号公報)。

【0006】この問題を解決するため、少なくとも2種類のモノクローナル抗体を用いたり、また、ポリクローナル抗体を用いる場合には、これとは別に1種以上のモノクローナル抗体を用いて感度の向上を図っていた。しかしながら、このような組み合わせを選定するするためには、一般に酵素免疫測定法を利用して行われるが、良い組み合わせが見つからない場合には、再度抗体を作製し直さなければならないという問題があった。

【0007】この抗体の組み合わせという煩雑な選定手段を解消するため、液体中に存在する抗原と、その抗原に対して特異的な抗体とを免疫学的に結合し、かつ標識抗体とを反応させて免疫複合体を形成した後、その免疫複合体と未反応物を物理的大きさに分けるためのフィルタを備え、未反応物を含む溶液を吸収すると共に、その免疫複合体を保持し、測定することにより試料の有無を

3
検知または定量する免疫測定装置が提案されている（特開平9-274039号公報）。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上述した免疫測定装置や免疫測定方法は、いずれも免疫複合体を定性的または半定量的に測定するに止まり、免疫複合体を濾過手段等により分離し、濾過手段を通過した未反応の標識物質を測定する方法については、全く示唆されていない。従って本発明は、標識レセプターとリガンドとを反応させて形成する複合体を分離手段により分離し、リガンドとの反応に関与しないで分離手段を通過した未反応の標識レセプターを測定する新規なリガンドの測定方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、リガンドと標識レセプターとの複合体を分離手段で捕捉し、分離手段を通過した未反応の標識レセプター量または未反応の標識リガンド量を測定することによって、更に一層精密な試料中の微量成分の測定が可能となることを見出し、本発明に到達した。

【0010】本発明は、以下の工程を含むリガンドの測定方法を特徴とする。

(a)リガンドに対して特異的なレセプター、および/または表面に前記リガンドに対して特異的な前記レセプターを有する粒子と、前記リガンドに対して特異的な標識レセプター、および/または表面に前記リガンドに対して特異的な前記標識レセプターを有する粒子と、前記リガンドを含む試料とを反応させて複合体を形成する工程、(b)形成した前記複合体を分離手段により分離する工程、(c)前記リガンドとの反応に関与しないで前記分離手段を通過した未反応の前記標識レセプター、または該未反応の標識レセプターを有する粒子を展開相で展開する工程、(d)展開した前記未反応の標識レセプター量を測定する工程。

【0011】また、本発明は、以下の工程を含むリガンドの測定方法を特徴とする。

(a)リガンドに対して特異的なレセプターおよび/または表面に前記リガンドに対して特異的な前記レセプターを有する粒子と、標識リガンドおよび/または標識リガンドを有する粒子と、前記リガンドを含む試料とを反応させて複合体を形成する工程、(b)形成した前記複合体を分離手段により分離する工程、(c)前記レセプターとの反応に関与しないで前記分離手段を通過した未反応の標識リガンド、または標識リガンドを有する粒子を展開相で展開する工程、(d)展開した前記未反応の標識リガンド量を測定する工程。

【0012】以下、本発明について更に詳細に説明する。

【0013】本発明において、測定可能なリガンドとし

ては、レセプターと特異的結合作用を有する限り、公知のものの中から適宜選択することができる。このリガンド/レセプターの具体例としては、抗原/抗体に限定されず、酵素/基質、一本鎖DNA/DNAの相補鎖、ビオチン/アビシンなどが挙げられる。特に免疫学的測定法に使用する場合には、リガンドは抗原（または抗体）に相当し、レセプターが抗体（または抗原）に相当する。抗体としては、抗原と特異的結合作用を有する限り、特に制限されず、通常使用されるポリクローナル抗体やモノクローナル抗体に加えて、重合化抗体、半分子抗体(ha IgG)、Fab_b、F(ab')₂、Fab'、Fv抗体フラグメントなどの加工抗体も好適に使用しうる。ここで、重合化抗体とは、抗体または蛋白質と抗体との共有結合性重合体をいい、半分子抗体とは、例えば還元剤で断片化した抗体分子をいう。このような免疫学的測定法としては、サンドイッチ型反応や競合型反応が好ましい方法として挙げられる。

【0014】本発明に適用できる試料検体としては、流体試料である、あらゆる形態の溶液やコロイド溶液が挙げられるが、好ましくは生物由来の流体試料、例えば、

20 血液、血清、血漿、尿、糞便懸濁液、髄液、唾液などが挙げられる。これら試料検体中に含まれるリガンドとしては、例えば、アルブミン、グロブリン、便中ヘモグロビンなどの蛋白質、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、インスリン、サイロキシン、エストロゲン等のホルモン、癌胎児性蛋白(CEA)、アルファフェトプロテイン(AFP)塩基性フェトプロテイン(BFP)等の癌マーカー、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒト成人T細胞白血病ウイルス(ATLV)、B型肝炎ウイルス(HBV)等のウイルス、インターロイキン-1(IL-1)、IL-2、IL-6等のサイトカイン、テオフィリン、フェニトイン、バルプロ酸等の薬剤、上皮成長因子(EGF)、血小板由来成長因子(PDFG)、肝細胞増殖因子(HGF)、血管内皮細胞成長因子(VEGF)等の各種成長因子、C反応性蛋白(CRP)等の炎症に関連する蛋白質、細菌や細胞等、またはこれらに対する抗体が挙げられる。

【0015】分析対象物の測定の指標となる標識は、クロマトグラフィー媒体上で反応させてリガンドと標識レセプターとの複合体を形成させて、この反応にあづからなかった未反応の標識レセプターまたは標識リガンドを検出手段で測定できる限り、公知の標識の中から適宜選択して使用することができる。その具体例としては、酵素、発色団、蛍光団、発光団、放射性同位元素、染色ゲル、金属コロイド、着色ラテックスなどが挙げられるが、特に測定の容易さや定量性の正確さを考慮すると酵素が好ましい。

【0016】このような酵素としては、パーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、グリセロール磷酸オキシダーゼ、サルコシンオキ

シダーゼ、コリンオキシダーゼ、アシルCoAオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼ、ウリカーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、および β -D-グルコシダーゼから成る群から選択されるものが挙げられる。

【0017】本発明において、複合体の分離手段としては、公知の複合体の捕捉手段の中から適宜選択すれば良く、例えばフィルターなどの多孔性膜、濾紙、多孔性セラミック、繊維層等の物理的分離手段が挙げられるが、特にメンプランフィルターが好ましい。この分離手段のボアサイズは、標識レセプター、または標識レセプター結合粒子は通過させるが、リガンドと標識レセプターまたは標識レセプター結合粒子との複合体は通過させないサイズであり、具体的には、10 nmから10 μ mの範囲であることが好ましい。

【0018】本発明においては、この分離手段を通過したりガンドとの反応に関与しなかった未反応の標識レセプター、それを有する粒子または標識リガンドを展開相で展開する工程が最も特徴とする点である。この未反応の標識レセプターや未反応の標識リガンドを測定することで従来法では得られなかつた高い感度でリガンド量を測定することができる。また、測定手段としては、目視による定性測定や半定量的測定、分光光度計や反射率測定装置等の検出器による定量測定が挙げられる。特に、反射率や透過率によって光学的に測定することで、更に一層精密な試料中の微量成分の定量測定が可能となる。

【0019】本発明で使用する展開相は、未反応の標識レセプターや未反応の標識リガンドを毛細管現象の作用により移行させるための媒体として機能するものであり、このような機能を有する限り、その材質は特に制限されるものではない。

【0020】そのような材料としては、例えば、濾紙、セルロース膜、ガラス繊維膜、ニトロセルロース膜、セルロースアセテート膜などが挙げられ、これらを単独で用いても良く、複合して用いても良い。これらの材料の中でも、特に濾紙やセルロースアセテート膜が抗体等の物理的吸着能や展開速度を容易に制御できるという観点から好ましい。クロマトグラフィー媒体の寸法も特に制限されないが、使用時においては、例えば幅2~10 mm、長さ5~150 mm、厚さ0.02~1.5 mmのものが好ましい。

【0021】本発明において使用される不溶性担体粒子としては、従来から免疫反応用の担体粒子として使用されているものの中から適宜選択して使用することができる。その具体例としては、例えば無機物質粉末や有機高分子物質粉末などが挙げられる。無機物質としては、特に限定されないが、金、チタン、鉄、ニッケル等の金属、アルミナ、チタニア等の金属酸化物、シリカ等が挙げられる。有機高分子としては、特に限定されないが、スチレン重合体、スチレンースチレンスルホン酸塩共重

合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリルトリル-ブダジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体等が挙げられるが、特にこれらの重合体粉末を水に均一に懸濁させたラテックス粒子が好ましい。

【0022】これら不溶性担体粒子への抗原または抗体の感作は、公知の方法に従って行うことができる。その具体例としては、例えば、グルタルアルデヒド、ビスジアゾベンジン、トリレンジトイソシアネート、ジフロロニトロベンゼン、カルボジイミド類、キノン類、塩化クロム、タンニン酸等のいわゆるカップリング剤を用いた化学的結合法や抗原または抗体と担体を水溶性溶媒中（例えば、水、生理食塩水、各種緩衝液など）で接触させる物理的吸着法等が挙げられる。

【0023】本発明には、特に必要とされないが、反応層や展開層における毛管現象の流速を調節するため、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル、ポリビニルアルコールなどの界面活性剤などを添加することも可能である。添加する界面活性剤としては、系全体の反応に悪影響を及ぼさない粘度を変化させるものならば、特に制限されず、公知の界面活性剤の中から適宜選択すれば良い。

【0024】

【発明の効果】本発明は、標識レセプターとリガンドとを反応させて形成する複合体を分離手段により分離し、リガンドとの反応に関与しないで分離手段を通過した未反応の標識レセプターを測定する新規なリガンドの測定方法であり、従来の方法に比べて一層精密な試料中の微量成分の測定が可能となる。

【0025】

【実施例】以下、本発明を試験例および実施例に基づき説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

【0026】試験例1. マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液の調製
マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（自家製、クローン1）600 μ g/mlの1mlと20mg/mlのラテックス乳液（セラダイン（株）社製、直径0.3 μ m）1mlとを0.02Mの40 PBS pH7.2溶液5ml中に混合し、37°Cで60分間インキュベーションした後、15,000rpmで20分間遠心した。得られた沈殿物に、10mg/mlのスキムミルク液を添加して、25°Cで3時間インキュベーションした後、抗体結合ラテックス懸濁液を得た。

【0027】試験例2. パーオキシダーゼ標識マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液の作製
酵素免疫学的測定法（医学書院 石川栄治、河合忠、宮井潔 編集p108-109 1987年度版）に従って過ヨウ素酸法によりパーオキシダーゼ（東洋紡（株）製）とマウス抗ヒトア

ルブミンモノクローナル抗体（自家製、クローン2）とからパーオキシダーゼ標識マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体を作成した。作成したパーオキシダーゼ標識マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体 600 μ g/mlの1mlと20mg/mlのラテックス懸濁液（セラダイン（株）製、直径0.3 μ m）1mlとを0.02MのPBS pH7.2溶液5ml中に混合し、37°Cで3時間インキュベーションした後、15,000 rpmで20分間遠心した。得られた沈殿物に、10mg/mlのスキムミルク液を添加して、25°Cで3時間インキュベーションした後、パーオキシダーゼ標識マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液を得た。

【0028】試験例3. ラテックス懸濁液含有シートの作製

試験例1で得た40mg/mlのマウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液 1 ml、試験例2で得た40mg/mlのパーオキシダーゼ標識マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液 1 ml、および 100mg/mlのグルコース液2mlを含有する0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.2）10mlを調製した。この調製液にポリエチレン製シート（旭化成（株） 厚さ1mm、含水量40 μ l/cm²）を浸漬後、これを凍結乾燥してラテックス懸濁液含有シートを得た。

【0029】試験例4. ラテックス懸濁液および酵素結合抗体固定シートの作製

試験例1で得た40mg/mlのマウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液 1 ml、試験例2で得た5mg/mlのパーオキシダーゼ標識マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体液 0.5 ml、および 100mg/mlのグルコース液2mlを含有する0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.2）10mlを調製した。この調製液にポリエチレン製シート（厚さ1mm、吸水量40 μ l/cm²）を浸漬後、これを凍結乾燥して酵素結合抗体固定シートを得た。

【0030】試験例5. パーオキシダーゼ検出用パッドの作製

グルコースオキシダーゼ（ロッシュ（株）社製 200 μ U/ml g）2.5 mgと2,7-ジアミノフルオレン塩酸塩（シグマ（株）社製）0.27 mgとを溶解した0.1MのMES緩衝液（pH6.0）100mlを調製した。この調製液に白濾紙（東洋濾紙（株）No.1、吸水量10 μ l/cm²）を浸漬後、45°Cで2時間送風乾燥し、さらに真空デシケーター中で3時間乾燥してパーオキシダーゼ検出用パッドを得た。

【0031】試験例6. 展開相の作製

幅5mm長さ20mmに切断した白濾紙（東洋濾紙（株）製 No.1、吸水量10 μ l/cm²）を幅5mm長さ50mmの塩化ビニル製支持体5の一端から15mmの位置に両面テープで張り付けて展開用白濾紙（展開相）3を得た。

【0032】実施例1. ヒトアルブミンの定量

試験例6で得た展開相3の一方の端に、試験例5で得た一辺5mm角切断のパーオキシダーゼ検出用パッド（酵素検出

発色パッド）4を重ねた。他方の端に7mm角の濾過用メンブレンフィルター2（東洋濾紙（株）製、セルロースアセテート膜、ポアサイズ 0.45 μ m）を重ね、更に下部の展開相3に直接触れないように、試験例3で得たラテックス懸濁液含有シート（抗原抗体反応パッド）1（幅5mm 長さ20mm）を重ね、ラテックス懸濁液含有シート1の一端から2mmの距離に位置する5mm角の部分を除いて全体をカバーフィルムにて覆い各々部品を固定して試験片を作製した（図1参照）。

10 【0033】作製した試験片のラテックス懸濁液含有パッド1部分に、ヒトアルブミン（シグマ（株）製）をそれぞれ0、6.25、12.5、25、50 μ g/ml含有するリン酸緩衝液100 μ lを滴下し、4分後に青色に呈色したパーオキシダーゼ検出用パッド4を色差計（東京電色（株））の商品名：カラーアナライザー TC-1800Mで測定した。測定した600nmの反射率（R値）を基に下記式にて算出したK/S値を縦軸に、ヒトアルブミン濃度を横軸にプロットし、標準定量曲線を作成した（図2参照）。図2に示すように、ヒトアルブミンの濃度に依存して、K/S値は小さくなる逆シグモイドの曲線を描き、本方法は定量性を有することが判明した。K/Sを算出するための計算式

$$K/S = (1-a) / 2a, \quad a = (600\text{nm} \text{における反射率}) / 100$$

【0034】実施例2. ヒトアルブミンの定量
 抗体固定シートとして試験例4で得たラテックス懸濁液および酵素標識抗体固定シートを、メンブレンフィルターとして東洋濾紙（株）製（セルロースアセテート膜、ポアサイズ 0.22 μ m）に使用した以外は、実施例1と全く同様の方法により試験片を作製した。作製した試験片のラテックス懸濁液および酵素結合抗体固定シート部分に、ヒトアルブミン（シグマ（株）製）をそれぞれ0、6.25、12.5、25、50 μ g/ml含有するリン酸緩衝液100 μ lを滴下し、4分後に青色に呈色したパーオキシダーゼ検出用パッドを色差計（東京電色（株））の商品名：カラーアナライザー TC-1800Mを用いて測定した。測定した600nmの反射率を基に実施例1の式にて算出したK/S値を縦軸に、ヒトアルブミン濃度を横軸にプロットし、標準定量曲線を作成した（図3参照）。図3に示すように、ヒトアルブミンの濃度に依存して、K/S値は小さくなる逆シグモイドの曲線を描き、本方法は定量性を有することが判明した。

【0035】試験例7. マウス抗塩基性フェトプロテインモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液の調製
 マウス抗塩基性フェトプロテインモノクローナル抗体（日本化薬（株）製）クローン No. K1 300 μ g/ml、およびクローン No. 5C6 300 μ g/mlの20mg/mlのラテックス乳液（セラダイン（株）製、直径0.3 μ m）1mlとを0.02MのPBS pH7.2溶液5ml中に混合し、37°Cで60分間インキュベーションした後、15,000 rpmで20分間遠心した。得られた沈殿物に、10mg/mlのウシアルブミン液を添加して、25°Cで3時間インキュベーションした後、抗体結合ラテック

ス懸濁液を得た。

【0036】試験例8.パーオキシダーゼ標識マウス抗塩基性フェトプロテインモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液の作製

試験例2と全く同様の方法によりパーオキシダーゼとマウス抗塩基性フェトプロテインモノクローナル抗体(日本化薬(株)製、クローンNo.5C2)とからパーオキシダーゼ標識マウス抗塩基性フェトプロテインモノクローナル抗体を得た。得られたパーオキシダーゼ標識マウス抗塩基性フェトプロテインモノクローナル抗体 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の 1ml と 20mg/ml のラテックス懸濁液(セラダイン(株)製、直径 0.3 μm) 1ml とを 0.02M の PBS pH7.2 溶液 5ml 中で混合し、37°Cで3時間インキュベーションした後、15,000 rpm で20分間遠心した。得られた沈殿物に、10mg/ml のウシアルブミン液を添加して、25°Cで3時間インキュベーションした後、パーオキシダーゼ標識マウス抗塩基性フェトプロテインモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液を得た。

【0037】試験例9.ラテックス懸濁液含有シートの作製

試験例7で得た 20mg/ml のマウス抗塩基性フェトプロテインモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液 1ml 、試験例8で得た 20mg/ml のパーオキシダーゼ標識マウス抗塩基性フェトプロテインモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液 1ml 、200mg/ml のポリエチレングリコール (#6000) 2ml 、および 100mg/ml のグルコース液 2ml を含有する 0.1 M のリン酸緩衝液 (pH7.2) 10ml を調製した。この調製液にポリエチレン製シート(厚さ 1mm、吸水量 40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) を浸漬後、これを凍結乾燥してラテックス懸濁液含有シートを得た。

【0038】試験例10.展開相の作製

幅 5mm 長さ 20mm に切断した白濾紙(東洋濾紙(株)製、No.1、吸水量 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) を幅 5mm 長さ 60mm の塩化ビニル製支持体 5 の一端から 30mm の位置に両面テープにて張り付けて展開相 3 を得た。

【0039】実施例3.塩基性フェトプロテインの定量試験例10で得た展開相3の一方の端に、試験例5で得た一辺 5mm 角切断のパーオキシダーゼ検出用パッド 4 を重ねた。他方の展開相3の端に一辺 7mm 角のメンブレンフィルター2(東洋濾紙(株)製、セルロースアセテート膜、ポアサイズ 0.45 μm) を重ね、更に下部の展開相3に直接触れないように、幅 5mm 長さ 20mm の展開相3(白濾紙)(東洋濾紙(株)製、No.1、吸水量 10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) の一端をフィルター2 上に重ねた(一辺 5mm 角で重なるように)。更に、その展開相3の他端に試験例9で得たラテックス懸濁液含有シート1(幅 5mm 長さ 20mm) を重ね(一辺 5mm 角で重なるように)、ラテックス懸濁液含有シート1の一端より 2mm の距離に位置する一辺 5mm 角の部分を除いて全体をカバーフィルムにて覆い各々部品を固定して、試験片を作製した(図4参照)。

【0040】作製した試験片のラテックス懸濁液含有シート部分に、塩基性フェトプロテイン(自家製)をそれぞれ 0、2、10、50、250ng/ml 含有するリン酸緩衝液 100 μl を滴下し、10分後に青色に呈色したパーオキシダーゼ検出用パッドを色差計(東京電色(株)製の商品名:カラーナライザー TC-1800M)を用いて測定した。測定した 600nm の反射率を基に実施例1の式にて算出した K/S 値を縦軸に、塩基性フェトプロテイン濃度を横軸にプロットし、標準定量曲線を作成した(図5参照)。図5に示すように、塩基性フェトプロテインの濃度に依存して、K/S 値は小さくなる逆シグモイドの曲線を描き、本方法は定量性を有することが判明した。

【0041】試験例11.抗体へのマレイミド基導入マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体(自家製) 5mg を 0.1M のりん酸緩衝液 pH7.2 360 μl に溶解した。この溶解液にジメチルホルムアミド 10mg/ml に溶解した N-(8-マレイミドカブリルオキシ)スルホスクシンイミドナトリウム塩(同仁化学(株)社製の商品名: Sulfo-HMCS) 70 μl を加え、30°Cで 30~60 分間反応させた。反応後、PD-10(ファルマシア(株)製の商品名)を用いてゲルろ過し、タンパク質部分を回収した。その後、マレイミド基導入 IgG の回収液を遠心濃縮にて、3.5mg/ml 程度まで濃縮した。

【0042】試験例12.抗体へのチオール基導入マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体(自家製) 10mg を 0.1M のりん酸緩衝液 pH7.2 1.0ml に溶解した。この溶解液にジメチルホルムアミド 1ml に 10mg の N-スクリニンイミジル S-アセチルチオアセテート(ピアース(株)社製)を溶解した溶液を 39 μl を加えた。30°Cで 30~90 分間反応させた後、1M のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン塩酸緩衝液 pH8.0 200 μl 、1M の塩酸ヒドロキシルアミン溶液 100 μl 、および 0.1M のエチレンジアミン四酢酸-0.1M のトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン溶液 50 μl を順次添加し、30°Cで 10~30 分間反応させた。反応後、0.01M のエチレンジアミン四酢酸を含有した 0.1M のりん酸緩衝液を溶離液として、PD-10(ファルマシア(株)製の商品名)を用いてゲルろ過し、タンパク質部分を回収した。さらに、SH 基導入抗体の回収液を遠心濃縮にて 3.5mg/ml 程度まで濃縮した。

【0043】試験例13.重合化抗体の作製

試験例11で得た 3.6mg のマレイミド基導入マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体と試験例12で得た 3.6mg のチオール基導入マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体とを混合し(反応比 1:1)、30°Cで 30~60 分間インキュベートした後、ゲル状の反応生成物を得た。得られた反応生成物を凍結乾燥して秤量した後、0.1M の HEPES-NaOH 緩衝液 pH7.5 を加えて再びゲルを水和し、氷冷しながら 10 分間超音波処理してゲルを破碎し、重合化抗体の懸濁液を調製した。粒度分布計 ELS-800(OTSUKA ELECTRONICS) を用いて重合化抗体の粒径を測定したところ、

11

平均粒径0.2463μmであった。

【0044】試験例14. パーオキシダーゼ標識重合化抗体の作製

試験例11から13と全く同様にして、マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（自家製）の均一重合化抗体を作製した。さらに均一重合化抗体の残存チオール基を利用して、パーオキシダーゼと化学結合させ、パーオキシダーゼ標識重合化抗体を作製した。

【0045】試験例15. マレイミド基導入パーオキシダーゼの作製

パーオキシダーゼ（東洋紡（株）製）8mgを0.1Mのリン酸緩衝液pH7.2, 0.6mlに溶解した。この溶解液に、DMF200μlに溶解した10mgのN-(6-マレイミドカブロイルオキシ)スクシンイミド（同仁化学（株）製の商品名：EMCS）60μlを加えて、30℃で60～90分間インキュベーションした。反応後、0.1Mのリン酸緩衝液pH7.2を溶出液とし、PD-10（ファルマシア（株）製）でゲルろ過し、マレイミド基導入パーオキシダーゼ部分を得た。

【0046】試験例16. 均一重合化抗体とマレイミド基導入パーオキシダーゼとの反応

マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（自家製）の均一重合化抗体3.5mg/ml溶液0.4mlと1.2mg/mlマレイミド基導入パーオキシダーゼ0.4mlとを混合し、30℃で60～90分間インキュベーションした。反応後、0.1Mのリン酸緩衝液（pH6.5）を用いて、TSK-GEL G4000SWXL（東ソー（株）製）でゲルろ過し、未反応のパーオキシダーゼを除去し、パーオキシダーゼ標識重合化抗体部分を得た。

【0047】試験例17. 重合化抗体とパーオキシダーゼ標識重合化抗体との固定シートの作製

試験例13で得た10mg/mlのマウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（自家製）の重合化抗体液1ml、試験例14で得た10mg/mlのパーオキシダーゼ標識マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体（自家製）の重合化抗体液1ml、200mg/mlのポリエチレングリコール（#6000）2ml、および100mg/mlのグルコース液2mlを含有する0.1Mのリン酸緩衝液（pH7.2）10mlを調製した。この調製液にポリエチレン製シート（厚さ1mm、吸水量40μl/cm²）を浸漬後、これを凍結乾燥して抗体固定シートを得た。

【0048】試験例18. 展開相の作製

幅5mm長さ30mmに切断した白漉紙（東洋漉紙（株）製、吸水量10μl/cm²）を幅5mm長さ80mmの塩化ビニル製支持体5の一端から30mmの位置に両面テープにて張り付けて展開相3を得た。

【0049】実施例4. ヒトアルブミンの定量

試験例18の方法で得た展開相3の一方の端（支持体の端から25mmの位置）から15mm離れた位置に、試験例5で得た一辺5mm角のパーオキシダーゼ検出用パッド4を重ね、他方の端に一辺5mm角の吸収性のメンブラン通過液吸収パッド6（ワットマン社（株）製の商品名：7クロマト、吸水量40

12

μl/cm²）を重ねた。更に、展開相の一端（支持体の端から30mmの位置）に一辺7mm角のメンブレンフィルター2（東洋漉紙（株）製、セルロースアセテート膜、ポアサイズ0.45μm）を重ね、下部の展開相3に直接触れないように、幅5mm長さ20mmの展開相3（東洋漉紙（株）製、吸水量10μl/cm²）の一端をフィルター2上に重ねた（一辺5mm角で重なるように）。更に、その展開相3の他端に試験例17で得た重合化抗体とパーオキシダーゼ標識重合化抗体との固定シート（幅5mm長さ20mm）を重ね（一辺5mm角で重なるよう）、ラテックス懸濁液含有シート1の一端より2mmの距離に位置する一辺5mm角の部分を除いて全体をカバーフィルムで覆い各々部品を固定して、試験片を作製した（図6参照）。

10

【0050】作製した試験片の重合化抗体およびパーオキシダーゼ標識重合化抗体との固定シート部分に、ヒトアルブミン（シグマ（株）製）をそれぞれ0、6.25、12.5、25、50μg/ml含有するリン酸緩衝液150μlを滴下し、5分後に青色に呈色したパーオキシダーゼ検出用パッドを色差計（東京電色（株）の商品名：カラーナライザーTC-1800M）を用いて測定した。測定した600nmの反射率を基に実施例1の式にて算出したK/S値を縦軸に、ヒトアルブミン濃度を横軸にプロットし、標準定量曲線を作成した（図7参照）。図7に示すように、ヒトアルブミンの濃度に依存して、K/S値は小さくなる逆シグモイドの曲線を描き、本方法は定量性を有することが判明した。

20

【0051】実施例5. ヒトアルブミンの定量

抗体固定シートとして試験例17で得た重合化抗体とパーオキシダーゼ標識抗体との固定シートを、メンブレンフィルター2として東洋漉紙（株）製、セルロースアセテート膜、ポアサイズ0.1μmを使用した以外は、実施例4と全く同様の方法により試験片を作製した。作製した試験片の重合化抗体およびパーオキシダーゼ標識抗体との固定シート部分に、ヒトアルブミン（シグマ（株）製）をそれぞれ0、6.25、12.5、25、50μg/ml含有するリン酸緩衝液150μlを滴下し、5分後に青色に呈色したパーオキシダーゼ検出用パッドを色差計（東京電色（株）の商品名：カラーナライザーTC-1800M）を用いて測定した。測定した600nmの反射率を基に実施例1の式にて算出したK/S値を縦軸に、ヒトアルブミン濃度を横軸にプロットし、標準定量曲線を作成した（図8参照）。図8に示すように、ヒトアルブミンの濃度に依存して、K/S値は小さくなる逆シグモイドの曲線を描き、本方法は定量性を有することが判明した。

30

【0052】試験例19. パーオキシダーゼ標識ヒトアルブミンの調製

マウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体の代りにヒトアルブミンを用いたこと以外は、試験例2.と全く同様な方法により、パーオキシダーゼ標識ヒトアルブミンを調製した。

【0053】試験例20. パーオキシダーゼ標識ヒトア

ルブミン固定シートの作製

試験例19. 得た500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペーオキシダーゼ標識ヒトアルブミン溶液1ml、および100mg/mlのグルコース溶液2mlを含有する0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.2)10mlを調製した。この調製液にポリエチレン製シート(厚さ1mm、含水量40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$)を浸漬後、これを凍結乾燥してペーオキシダーゼ標識ヒトアルブミン固定シートを得た。

【0054】試験例21. ラテックス懸濁液含有シートの作製

試験例1で得た40mg/mlのマウス抗ヒトアルブミンモノクローナル抗体結合ラテックス懸濁液1mlおよび100mg/mlのグルコース液2mlを含有する0.1Mのリン酸緩衝液(pH7.2)10mlを調製した。この調製液にポリエチレン製シート(厚さ1mm、含水量40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$)を浸漬後、これを凍結乾燥してラテックス懸濁液含有シートを得た。

【0055】試験例22. 展開相の作製

幅5mm長さ20mmに切断した白濾紙(東洋濾紙(株)製、吸水量10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$)を幅5mm長さ80mmの塩化ビニル製支持体5の一端から45mmの位置に両面テープにて張り付けて展開相3を得た。

【0056】実施例6. ヒトアルブミンの定量

試験例22の方法で得た展開相3の一方の端(支持体の端から15mmの位置)に、試験例5で得た一辺5mm角のペーオキシダーゼ検出用パッド4を重ねた。更に、展開相3の一方の端(支持体の端から45mmの位置)に一辺7mm角のメンブレンフィルター2(東洋濾紙(株)製、セルロースアセテート膜、ポアサイズ 0.20 μm)を重ね、下部の展開相3に直接触れないように、幅5mm長さ20mmの展開相3(白濾紙)《東洋濾紙(株)製、吸水量10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ 》の一端をフィルター上に重ねた(一辺5mm角で重なるように)。その展開相3の他端に試験例21で得たラテックス懸濁液固定シート1(幅5mm長さ20mm)を重ねた(一辺5mm角で重なるように)。更に、そのラテックス懸濁液含有シート1の一端に試験例20で得たペーオキシダーゼ標識ヒトアルブミン固定パッド7(幅5mm長さ20mm)を入れ(2mmの重なりとなるように)、ペーオキシダーゼ標識ヒトアルブミン固定シート7の一端より2mmの距離に位置する一辺5mm角の部分を除いて全体をカバーフィルムにて覆い各々部品を固定して、試験片を作製した(図9参照)。

【0057】作製した試験片のペーオキシダーゼ標識ヒトアルブミン固定シート7の部分に、ヒトアルブミン(シグマ(株)製)をそれぞれ 0、12.5、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有するリン酸緩衝液150 μl を滴下し、5分後に青色に呈色したペーオキシダーゼ検出用パッドを色差計(東京電色(株)の商品名: カラーアナライザー TC-1800M)を用いて測定した。測定した600nmの反射率を基に実施例1の

式にて算出したK/S値を縦軸に、ヒトアルブミン濃度を横軸にプロットし、標準定量曲線を作成した(図10参照)。図10に示すように、ヒトアルブミンの濃度に依存して、K/S値は大きくなるシグモイドの曲線を描き、本方法は定量性を有することが判明した。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明に係る一実施例である試験片の模式図である。

【図2】本発明に係る試験片を用いたヒトアルブミン検体測定の実施例1におけるアルブミン濃度と600nmの反射率から算出されるK/S値をプロットしたグラフである。

【図3】本発明に係る試験片を用いたヒトアルブミン検体測定の実施例2におけるアルブミン濃度と600nmの反射率から算出されるK/S値をプロットしたグラフである。

【図4】本発明に係る試験片の好ましい形態の一例の模式図である。

【図5】本発明に係る試験片を用いた塩基性フェトプロテイン検体測定の実施例3における塩基性フェトプロテイン濃度と600nmの反射率から算出されるK/S値をプロットした曲線を示すグラフである。

【図6】本発明に係る試験片の好ましい形態の一例の模式図である。

【図7】本発明に係る試験片を用いたヒトアルブミン検体測定の実施例4におけるアルブミン濃度と600nmの反射率から算出されるK/S値をプロットした曲線を示すグラフである。

【図8】本発明に係る試験片を用いたヒトアルブミン検体測定の実施例5におけるアルブミン濃度と600nmの反射率から算出されるK/S値をプロットした曲線を示すグラフである。

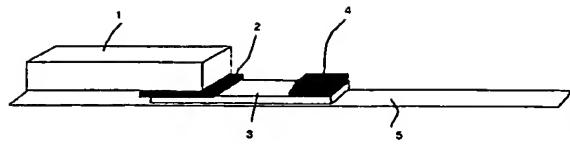
【図9】本発明に係る試験片の好ましい形態の一例の模式図である。

【図10】本発明に係る試験片を用いたヒトアルブミン検体測定の実施例6におけるアルブミン濃度と600nmの反射率から算出されるK/S値をプロットした曲線を示すグラフである。

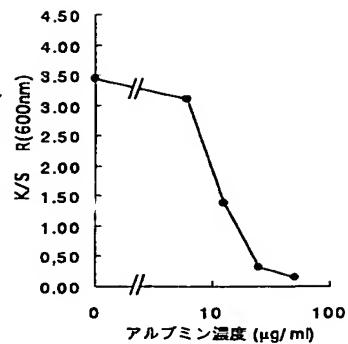
【符号の説明】

40	1	抗原抗体反応用パッド
	2	メンブレンフィルター
	3	展開相
	4	酵素検出発色パッド
	5	支持体
	6	メンブレン通過液吸収パッド
	7	固定シート

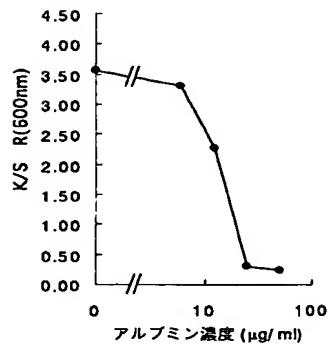
【図1】



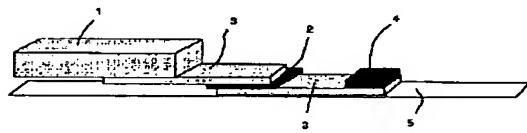
【図2】



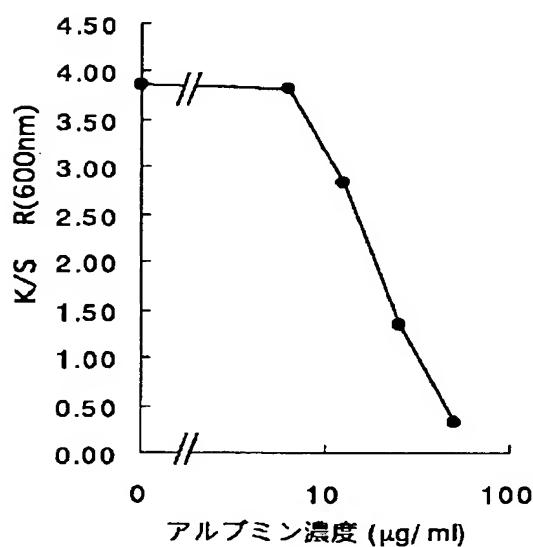
【図3】



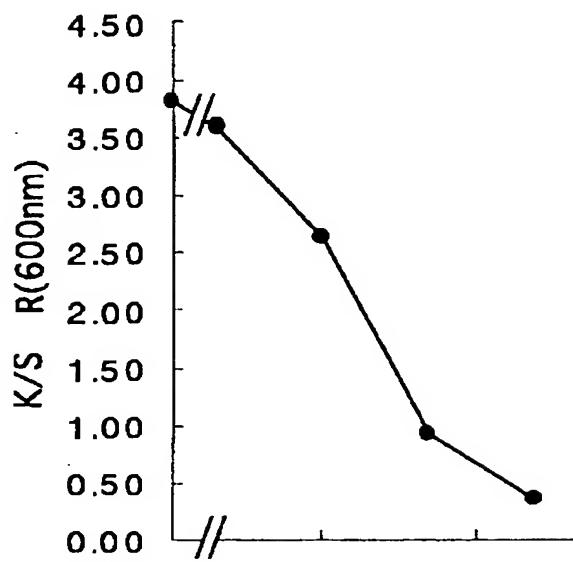
【図4】



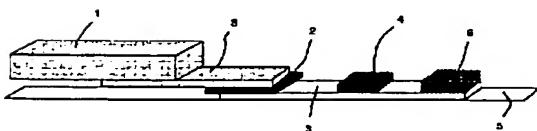
【図7】



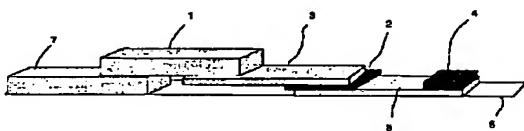
【図5】



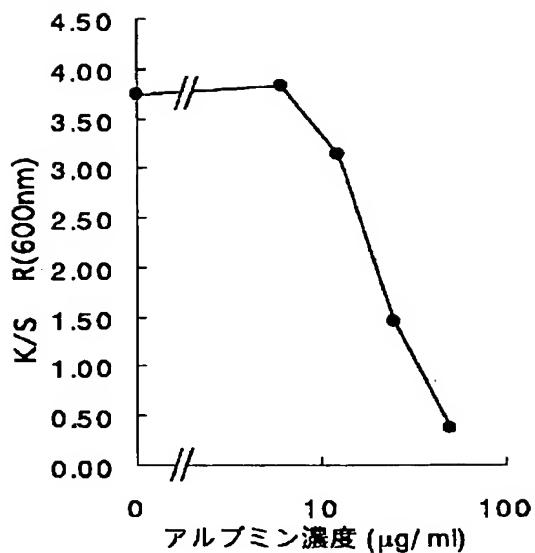
【図6】



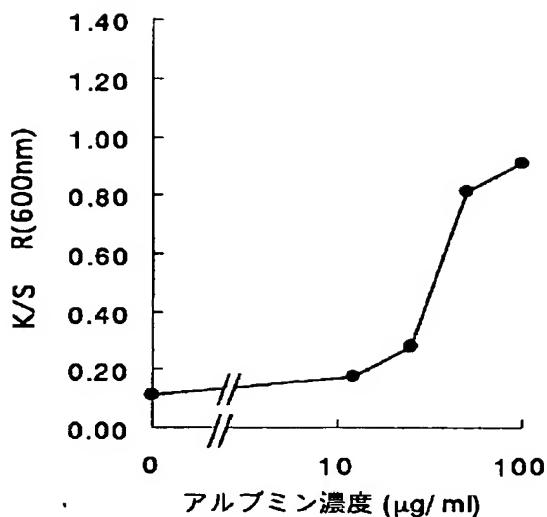
【図9】



【図8】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7	識別記号	F I	テマコト (参考)
G 0 1 N 33/545		G 0 1 N 33/545	A
33/553		33/553	
// G 0 1 N 33/537		33/537	

F ターム(参考) 4B033 NA22 NB12 NB27 NB32 NB45
 NB62 NB63 NB65 NB68 ND03
 NG09 NG10 NH06
 4B063 QA01 QA18 QQ01 QQ03 QQ67
 QQ70 QQ75 QQ79 QQ87 QR02
 QR13 QR82 QR85 QS15 QS17
 QX01